Ver.1.00

Easy-WESTERN Super

ウェスタンブロティング用一次抗体検出試薬キット

（高感度 Western Blotting 用）

取扱説明書

Beacle, Inc.

OKAYAMA　JAPAN

（試薬の保存と取扱上の注意）

1. 本試薬到着後、抗体検出試薬（MAD 試薬）は速やかに-20℃で保存ください。また、使用後も速やかに-20℃に保存してください。劣化の原因となります。
2. 希釈バッファー（20 倍濃縮）は 4℃で保存ください。
3. マーカー検出試薬は 4℃で保存ください。

---- 目　次 ----

（1） はじめに …… 2
（2） 製品内容 …… 2
（3） 関連製品のご案内 …… 2
（4） 準備と付属試薬の使用方法 …… 2
（5） 一般的な使用方法 …… 3
（6） リプロービング時に利用する方法 …… 3
（7） 二次抗体反応の増感に利用する方法 …… 3
（8） その他 …… 3
（9） トラブルシューティング …… 4
（10） お問合わせ先 …… 4

ご注意

1. 本試薬は研究用試薬です。診断・臨床用試薬としては使用しないでください。
2. Easy-WESTERN 試薬は、劣化を防ぐため上記の保存条件を守ってください。

（1） はじめに

Easy-WESTERN は、独自開発のマルチ抗体検出（MAD）試薬を利用したウェスタンブロティング専用の一次抗体検出試薬キットです。本キットを利用することによって、標識二次抗体なしで、各種の一次抗体の検出が可能となります。また、本キットを利用することによって従来法では出来なかった高感度検出、シグナル増強、迅速検出、同時検出等多くのメリットを得ることが出来ます。

Easy-WESTERN には Easy-WESTERN Super と Easy-WESTERN Quickの 2 種が用意されています。どちらの製品も同じ成分と構成ですが、Easy-WESTERN Super は高感度検出、シグナル増強を向けのマニュアルが添付されており、Easy-WESTERN Quickには迅速検出、同時検出を向けのマニュアルが添付されています。 なお、何れのマニュアルも当社 HP よりダウンロードできます。

【原理】

本試薬の主要成分である MAD 試薬の本体は、高抗体結合能を有するタンパク質を約 100 分子提示するタンパク質粒子です。各粒子はそれぞれ凡そ 50 分子の HRP が標識されています。こうした性質のため、本試薬は高感度、迅速検出などを可能とします。

●本製品の特長●

1. **二次抗体が不要**： 殆どの一次抗体を検出することが可能であり[1]*、一次抗体の動物種に対する各種二次抗体を準備する必要がありません。
2. **二次抗体を用いる従来法に比べ高いシグナルを得ることが可能**[2]*： **低い発現量の抗原検出が可能となります。また、一次抗体量を減らすことができ、高価な一次抗体の節約につながります。**
3. **二次抗体で検出したシグナルの増強が可能**： 二次抗体利用法で検出したシグナルが弱い場合、メンブレンを洗浄し、本試薬との反応により再度検出することでより高いシグナルを得ることができます。
4. **使用方法が容易**： **キット付属の MAD 試薬を希釈し、二次抗体の代わりに使用するだけです。**

注： 1） 一部検出し難い抗体種（主なものとしてマウス IgG1、Goat IgG）がありますが、マウス IgG1 の場合専用増強試薬によって高感度検出が可能です。
2） 検出する抗原や用いる抗体によって性能は異なります。

（2） 製品内容（本マニュアルは以下の全製品に適用されます）

製品番号	製品名	内容
BCL-EZS01	Easy-WESTERN Super 基本セット	MAD 試薬、希釈バッファー、50 回分
BCL-EZS02	Easy-WESTERN Super マーカー検出セット	基本セット＋マーカー検出試薬、50 回分
BCL-EZS04	Easy-WESTERN Super マウス増感セット	基本セット＋マウス IgG 増感試薬、50 回分
BCL-EZS03	Easy-WESTERN Super フルセット	基本セット＋マウス IgG 増感試薬＋マーカー検出試薬、50 回分

使用回数は 10mlの実験系を用いた場合の数値を示しています。

（3） 関連製品のご案内

製品番号	製品名	製品概要	参考価格
BCL-EZQ01	Easy-WESTERN Quick 基本セット	One-step、同時検出用 （50 回分）	¥30,000
BCL-EZM01	マーカー検出試薬	Easy-WESTERN 用 （50 回分）	¥3,500
BCL-EZE01	マウス IgG 増感試薬	Easy-WESTERN 用 （50 回分）	¥3,500
BCL-EZB01	希釈バッファー	Easy-WESTERN 用（20 倍濃縮、50mL）	¥3,500
BCL-125A	Signal Booster Solution A (250mL)	一次抗体反応増強試薬	¥9,500

その他の関連製品もあります。当社 HP をご覧下さい。

（4） 準備、及び、マーカー検出試薬とマウス IgG 増強試薬の使用方法

1. 20 倍濃縮希釈バッファーは必要量を精製水で 20 倍に希釈してください。MAD 試薬は、この希釈バッファーに 5%となるようにスキムミルクを加えたものへ希釈して利用します。
2. TBS-T（150mM NaCl、10mM Tris－HCl、0.1% Tween-20、pH 7.6）、ブロッキング用スキムミルク（スキムミルク以外のブロッキング剤も利用可能です）を準備下さい

3. マーカー検出試薬は MagicMark XP(Invitrogen)などの二次抗体で検出する分子量マーカーの検出を本キットで可能とする試薬です。
使用する時は、本試薬を一次抗体反応液中に10000倍希釈になるように添加してください。以降は後述の各手順に従って操作してください。
4. マウス IgG 増感試薬はマウス IgG で反応が弱い時に使用する試薬です。特に、IgG1 を用いる場合には必須です。使用方法は下記の通りです。
①本増感試薬を 5%スキムミルク含有バッファーに 2000 倍希釈になるよう添加・混合します。
②これに MAD 試薬を加え MAD 試薬希釈液を調製します。これ以降は下記の各操作手順に従ってください。 なお、「二次抗体の代りに利用する方法」以外の手法で利用される場合には、予め予備検討を行うことをお勧めします。

(5) 二次抗体の代わりに利用する場合の使用方法

最も一般的な利用方法で、より高い感度や強いシグナルを得る時に利用する方法です。

1. SDS-PAGE により目的のタンパク質を分離する。
2. SDS-PAGE のゲルからタンパク質を PVDF メンブレンに転写する。
3. メンブレンを 5%スキムミルク/TBS-T で 1 時間(室温)ブロッキングする。
4. TBS-T で洗浄(5 分× 3 回)する。
5. 一次抗体を 1%スキムミルク含有 TBS-T で希釈し 1 時間(室温)反応させる (メーカー推奨希釈倍率からお試しください。抗体によっては、さらに 5 倍程度まで希釈しても十分なバンドが検出可能です。希釈液に別売の Signal Booster solution A を用いるとさらに増強できます。
6. TBS-T で洗浄(5 分× 3 回)する。
7. MAD 試薬を 5%スキムミルク含有希釈バッファーで 2000 倍に希釈し、メンブレンと 1 時間(室温)反応させる。MAD 試薬は 1000 倍～4000 倍の希釈範囲で最適倍率を決定ください。
8. TBS-T で洗浄(5 分× 5 回)する。
9. 市販の HRP 検出試薬(化学発光)を用いて、シグナルを検出する。

(6) リプロービング時に増感用に利用する場合の使用方法

通常の WB で弱かったシグナルの強度を高めて再検出する場合の利用方法です。

2. 二次抗体を用いた従来法で検出シグナルが弱かったメンブレン
(乾燥したメンブレンは利用できません)
3. TBS-T で洗浄(5 分× 3 回)する。
4. 希釈した MAD 試薬と反応させる。((5)の 7 に記載した手法で行います)
5. TBS-T で洗浄(5 分× 5 回)する。
6. 市販の HRP 検出試薬(化学発光)を用いて、シグナルを検出する。

(7)二次抗体反応の増感に利用する方法

通常の二次抗体反応に追加してシグナルを増強させる場合に利用する手法です。

1. (5)の 1～6 と同様の操作を行う。
2. 二次抗体と反応させる(一次抗体の動物種に対する二次抗体を選択してください)。
3. TBS-T で洗浄(5 分× 3 回)する。
4. 希釈した MAD 試薬と反応させる。((5)の 7 に記載した手法で行います)
5. TBS-T で洗浄(5 分× 5 回)する。
6. 市販の HRP 検出試薬(化学発光)を用いて、シグナルを検出する。

(8)その他

本試薬は非常に多くの可能性を秘めています。マニュアルに示した以外の使用方法もあります。多くは未だ検討中であり、且つユーザーが少ないと判断されるため公開しておりません。要望があればお知らせしますので、具体的な目的を沿えてご連絡下さい。

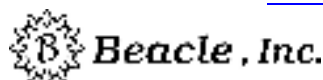
(9) トラブルシューティング

トラブル	原因と対策
シグナルが弱い	1. 抗原タンパク質濃度が低い。できる限り濃い試料を電気泳動してください。
	2. 抗体濃度が低い。最適な抗体濃度を検討してください。
	3. 膜への転写が不十分。電流量を上げるか、転写時間を延長してください。
	4. ブロッキングが強すぎる。オーバーナイトなどでブロッキングを強くしすぎるとシグナルが弱くなる場合があります。
	5. 一次抗体が、Easy-WESTERN では検出し難い抗体種(マウス IgG_1、Goat IgG)である。検出し難い抗体種以外の標識二次抗体をお持ちの場合は、「増感試薬としての利用法」を検討してください。
	6. MAD 試薬が吸着した。MAD 試薬をブロッキング剤を含まないバッファーで希釈する場合には低吸着チューブを利用ください。
バンドの一部が抜ける	7. 抗原量が多すぎる、又は抗体濃度が高すぎる。過剰なシグナルにより発光が抑えられることがあります。最適な抗原量・抗体濃度を検討してください。
エキストラバンドが多い	8. 抗体濃度が高すぎる。過剰な抗体により、非特異的なシグナルが増大することがあります。最適な抗体濃度を検討してください。
	9. タンパク質量が多すぎる。電気泳動するタンパク質量を減らしてください。
	10. ブロッキング不足。5%スキムミルク/TBS-T で 1 時間ブロッキングするなど、ブロッキングを強くしてください。
	11. MAD 試薬の劣化。室温又は 4℃で長期保存した場合、劣化しバンドが出る場合があります。MAD 試薬の濃度を下げるか新しいものに代えてください。
バックグラウンドが高い	12. 洗浄が不十分、又はブロッキングが不十分。洗浄回数や洗浄時間を増やす、又はブロッキング剤濃度や時間を増やしてください。
	13. 抗体濃度が高い、又は反応時間が長い。抗体濃度を低くするか、抗体との反応時間を短くしてください。
	14. MAD 試薬の濃度が高すぎる。濃度を下げてください。
	15. 一次抗体希釈液として抗原抗体反応増強剤を使用した場合、洗浄を十分に行わないとバックグラウンドが高くなる場合があります。一次抗体反応後の洗浄の回数や時間を増やしてください。
同時検出において、一方のバンドが通常検出時よりシグナルが弱い	16. 各種一次抗体と EZW の反応性が異なる。シグナルが弱い方の一次抗体濃度を増やしてください。
	17. 一次抗体反応後の洗浄が不十分。洗浄回数や時間を増やしてください。
	18. 別の抗体を用いて WB を行っているメンブレンと同一洗浄液内で洗浄している。微量残存する抗体と MAD 試薬の相互作用により、一方のシグナルが弱くなる場合があります。各メンブレンは独立して洗浄してください。
ワンステップ法で検出不能	19. 精製純度の低い一次抗体(抗血清など)を使用する場合、目的のバンドが検出されないことがあります。精製抗体を用いる、又は 2 段階法で検出してください。

(Easy-WESTERN Quick 用のトラブルシューティングも含まれています)

(10) お問合せ先

株式会社ビークル【製造発売元】
〒701-1221 岡山市北区芳賀 5303
TEL/FAX: 086-286-8091
E-mail: technical-support@beacle.com
Website: www.beacle.com

Ver.1.00

Easy-WESTERN Quick

ウェスタンブロッティング用一次抗体検出試薬キット

（ワンステップ、同時検出用）

取扱説明書

Beacle, Inc.

OKAYAMA　JAPAN

（試薬の保存と取扱上の注意）

1. 本試薬到着後、抗体検出試薬（MAD 試薬）は速やかに-20℃で保存ください。また、使用後も速やかに-20℃に保存してください。劣化の原因となります。
2. 希釈バッファー（20 倍濃縮）は 4℃で保存ください。
3. マーカー検出試薬は 4℃で保存ください。

---- 目　次 ----

（1）はじめに ………………………………………… 2
（2）製品内容 ………………………………………… 2
（3）関連製品のご案内 ………………………………… 2
（4）準備と付属試薬の使用方法 ……………………… 2
（5）一般的な使用方法 ………………………………… 3
（6）ワンステップ法で検出する場合の使用方法 ………… 3
（7）複数抗原を同時検出する場合の使用方法 ………… 3
（8）その他 ………………………………………………… 3
（9）トラブルシューティング ……………………………… 4
（10）お問合わせ先 ……………………………………… 4

ご注意

1. 本試薬は研究用試薬です。診断・臨床用試薬としては使用しないでください。
2. Easy-WESTERN 試薬は、劣化を防ぐため上記の保存条件を守ってください。

（1） はじめに

Easy-WESTERN は、独自開発のマルチ抗体検出（MAD）試薬を利用したウェスタンブロティング専用の一次抗体検出試薬キットです。本キットを利用することによって、標識二次抗体なしで、各種の一次抗体の検出が可能となります。また、本キットを利用することによって従来法では出来なかった高感度検出、シグナル増強、迅速検出、同時検出等多くのメリットを得ることが出来ます。

Easy-WESTERN には Easy-WESTERN Super と Easy-WESTERN Quickの 2 種が用意されています。どちらの製品も同じ成分と構成ですが、Easy-WESTERN Super は高感度検出、シグナル増強を向けのマニュアルが添付されており、Easy-WESTERN Quickには迅速検出、同時検出を向けのマニュアルが添付されています。 なお、何れのマニュアルも当社 HP よりダウンロードできます。

【原理】
本試薬の主要成分である MAD 試薬の本体は、高抗体結合能を有するタンパク質を約 100 分子提示するタンパク質粒子です。各粒子はそれぞれ凡そ 50 分子の HRP が標識されています。こうした性質のため、本試薬は高感度、迅速検出などを可能とします。

●本製品の特長●

1. **二次抗体が不要**： 殆どの一次抗体を検出することが可能であり、一次抗体の動物種に対する各種二次抗体を準備する必要がありません。
2. **ワンステップ検出による時間短縮が可能**： 本試薬を予め一次抗体と混合することで、一次抗体反応時間をなくし、1 ステップでの検出により、大幅に時間を短縮することができます。
3. **複数抗原の同時検出が可能**： 一度に複数の一次抗体と反応させることで、複数抗原の同時検出が可能です。この時、異なる動物種由来の一次抗体であっても検出することができます。

注： 1）一部検出し難い抗体種（主なものとしてマウス IgG1、Goat IgG）がありますが、マウス IgG1 の場合専用増強試薬によって高感度検出が可能です。
2）検出する抗原や用いる抗体によって性能は異なります。

（2） 製品内容（本マニュアルは以下の全製品に適用されます）

製品番号	製品名	内容
BCL-EZQ01	Easy-WESTERN Quick 基本セット	MAD 試薬、希釈バッファー、50 回分
BCL-EZQ02	Easy-WESTERN Quick マーカー検出セット	基本セット＋マーカー検出試薬、50 回分
BCL-EZQ04	Easy-WESTERN Quick マウス増感セット	基本セット＋マウス IgG 増感試薬、50 回分
BCL-EZQ03	Easy-WESTERN Quick フルセット	基本セット＋マウス IgG 増感試薬＋マーカー検出試薬、50 回分

使用回数は 10mlの実験系を用いた場合の数値を示しています。

（3） 関連製品のご案内

製品番号	製品名	製品概要	参考価格
BCL-EZS01	Easy-WESTERN Super 基本セット	高感度検出用 （50 回分）	¥30,000
BCL-EZM01	マーカー検出試薬	Easy-WESTERN 用 （50 回分）	¥3,500
BCL-EZE01	マウス IgG 増感試薬	Easy-WESTERN 用 （50 回分）	¥3,500
BCL-EZB01	希釈バッファー	Easy-WESTERN 用（20 倍濃縮、50mL）	¥3,500
BCL-125A	Signal Booster Solution A (250mL)	一次抗体反応増強試薬	¥9,500

その他の関連製品もあります。当社 HP をご覧下さい。

（4） 準備、及び、マーカー検出試薬とマウス IgG 増強試薬の使用方法

1. 20 倍濃縮希釈バッファーは必要量を精製水で 20 倍に希釈してください。MAD 試薬は、この希釈バッファーに 5%となるようにスキムミルクを加えたものへ希釈して利用します。
2. TBS-T（150mM NaCl、10mM Tris－HCl、0.1% Tween-20、pH 7.6）、ブロッキング用スキムミルク（スキムミルク以外のブロッキング剤も利用可能です）を準備下さい。
3. マーカー検出試薬は MagicMark XP（Invitrogen）などの二次抗体で検出する分子量マーカーの検出を本キットで可能とする試薬です。使用する時は、本試薬を一次抗体反応液中に 10000 倍希釈になるように添加してください。以降は後述の各手順に従って操作してください。

4. マウス IgG 増感試薬はマウス IgG で反応が弱い時に使用する試薬です。特に、IgG1 を用いる場合には必須です。使用方法は下記の通りです。
①本増感試薬を 5%スキムミルク含有バッファーに 2000 倍希釈になるよう添加・混合します。
②これに MAD 試薬を加え MAD 試薬希釈液を調製します。これ以降は下記の各操作手順に従ってください。 なお、「二次抗体の代りに利用する方法」以外の手法で利用される場合には、予め予備検討を行うことをお勧めします。

(5) 二次抗体の代わりに利用する場合の使用方法

最も一般的な利用方法で、より高い感度や強いシグナルを得る時に利用する方法です。

1. SDS-PAGE により目的のタンパク質を分離する。
2. SDS-PAGE のゲルからタンパク質を PVDF メンブレンに転写する。
3. メンブレンを 5%スキムミルク/TBS-T で 1 時間(室温)ブロッキングする。
4. TBS-T で洗浄(5 分× 3 回)する。
5. 一次抗体を 1%スキムミルク含有 TBS-T で希釈し 1 時間(室温)反応させる (メーカー推奨希釈倍率からお試しください。抗体によっては、さらに 5 倍程度まで希釈しても十分なバンドが検出可能です。希釈液に別売の Signal Booster solution A を用いるとさらに増強できます。
6. TBS-T で洗浄(5 分× 3 回)する。
7. MAD 試薬を 5%スキムミルク含有希釈バッファーで 2000 倍に希釈し、メンブレンと 1 時間(室温)反応させる。MAD 試薬は 1000 倍~4000 倍の希釈範囲で最適倍率を決定ください。
8. TBS-T で洗浄(5 分× 5 回)する。
9. 市販の HRP 検出試薬(化学発光)を用いてシグナルを検出する。

(6) ワンステップ法で検出する場合の使用方法

ワンスッテプ法で 60 分間の迅速検出を行う手法です。条件を変えることで高感度検出も可能です。

1. (5)の 1~2 まで同じ操作をする。
2. メンブレンを 5%スキムミルク/TBS-T で 5 分間(室温)ブロッキングする。
3. 一次抗体とMAD 試薬を5%スキムミルク含有希釈バッファーで希釈・混合する。(一次抗体はメーカー推奨希釈倍率からお試しください。MAD 試薬は 2000 倍を推奨します。混合後 5 分で使用可能です。NaN_3を含有する一次抗体液を利用する場合、一次抗体希釈後に MAD 試薬を混合し、NaN_3の終濃度が 0.001%以下になるようにしてください)
4. タンパク質を転写したメンブレンと 2. で調製した混合液とを 30 分(室温)反応させる。
5. TBS-T で洗浄(5 分× 5 回)する。
6. 市販の HRP 検出試薬(化学発光)を用いてシグナルを検出する。

(重要)本法で高感度検出するには、2 のブロッキング時間を 30 分、4 のメンブレンとの反応時間を最大 1 時間まで延長してください。

(7) 複数抗原を同時検出する場合の使用方法

複数の抗原を一度に検出する場合の手法です。2 段階反応法で検出します。

1. (5)の 1~4 と同様の操作を行う。
2. 2 種以上の一次抗体を同時にメンブレンと 1 時間(室温)反応させる (メーカー推奨希釈倍率からお試しください。各一次抗体を 1%スキムミルク含有 TBS-T 中で希釈・混合し、それぞれが目的希釈倍率になるように調製してください)。
3. TBS-T で洗浄(5 分× 5 回)する。
4. メンブレンを希釈した MAD 試薬と反応させる。((5)の 7 参照)
5. TBS-T で洗浄(5 分× 5 回)する。
6. 市販の HRP 検出試薬(化学発光)を用いてシグナルを検出する。

(9) トラブルシューティング

トラブル	原因と対策
シグナルが弱い	1. 抗原タンパク質濃度が低い。できる限り濃い試料を電気泳動してください。
	2. 抗体濃度が低い。最適な抗体濃度を検討してください。
	3. 膜への転写が不十分。電流量を上げるか、転写時間を延長してください。
	4. ブロッキングが強すぎる。オーバーナイトなどでブロッキングを強くしすぎるとシグナルが弱くなる場合があります。
	5. 一次抗体が、Easy-WESTERN では検出し難い抗体種(マウス IgG_1、Goat IgG)である。検出し難い抗体種以外の標識二次抗体をお持ちの場合は、「増感試薬としての利用法」を検討してください。
	6. MAD 試薬が吸着した。MAD 試薬をブロッキング剤を含まないバッファーで希釈する場合には低吸着チューブを利用ください。
バンドの一部が抜ける	7. 抗原量が多すぎる、又は抗体濃度が高すぎる。過剰なシグナルにより発光が抑えられることがあります。最適な抗原量・抗体濃度を検討してください。
エキストラバンドが多い	8. 抗体濃度が高すぎる。過剰な抗体により、非特異的なシグナルが増大することがあります。最適な抗体濃度を検討してください。
	9. タンパク質量が多すぎる。電気泳動するタンパク質量を減らしてください。
	10. ブロッキング不足。5%スキムミルク/TBS-T で 1 時間ブロッキングするなど、ブロッキングを強くしてください。
	11. MAD 試薬の劣化。室温又は 4℃で長期保存した場合、劣化しバンドが出る場合があります。MAD 試薬の濃度を下げるか新しいものに代えてください。
バックグラウンドが高い	12. 洗浄が不十分、又はブロッキングが不十分。洗浄回数や洗浄時間を増やす、又はブロッキング剤濃度や時間を増やしてください。
	13. 抗体濃度が高い、又は反応時間が長い。抗体濃度を低くするか、抗体との反応時間を短くしてください。
	14. MAD 試薬の濃度が高すぎる。濃度を下げてください。
	15. 一次抗体希釈液として抗原抗体反応増強剤を使用した場合、洗浄を十分に行わないとバックグラウンドが高くなる場合があります。一次抗体反応後の洗浄の回数や時間を増やしてください。
同時検出において、一方のバンドが通常検出時よりシグナルが弱い	16. 各種一次抗体と EZW の反応性が異なる。シグナルが弱い方の一次抗体濃度を増やしてください。
	17. 一次抗体反応後の洗浄が不十分。洗浄回数や時間を増やしてください。
	18. 別の抗体を用いて WB を行っているメンブレンと同一洗浄液内で洗浄している。微量残存する抗体と MAD 試薬の相互作用により、一方のシグナルが弱くなる場合があります。各メンブレンは独立して洗浄してください。
ワンステップに関して	19. 精製純度の低い一次抗体(抗血清など)を使用する場合、目的のバンドが検出されないことがあります。その場合は、通常の方法で行ってください。

(Easy-WESTERN Super 用のトラブルシューティングも含まれています)

(10) お問合せ先

株式会社ビークル【製造発売元】
〒701-1221 岡山市北区芳賀 5303
TEL/FAX: 086-286-8091
E-mail: technical-support@beacle.com
Website: www.beacle.com